

サーファクタントの生理的活性に必要な脂質の種類を検討

金沢大学医学部医学科麻酔・蘇生学講座 (主任: 小林 勉教授)

高 橋 麗 子

サーファクタントの活性に必要な脂質の種類を同定する目的で、いくつかの合成脂質を組み合わせたものに、サーファクタント関連蛋白質 B と C (surfactant-associated protein B/C, SP-B/C) を加えた 4 種類の再構築サーファクタント (synthetic reconstituted surfactant, SRS) を作成した。使用した合成脂質は、合成ジパルミトイルホスファチジルコリン (synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine, S-DPPC)、卵黄由来のホスファチジルグリセロール (egg phosphatidylglycerol, e-PG)、および合成ジオレイルホスファチジルコリン (synthetic dioleoylphosphatidylcholine, S-DOPC) であった。基準サーファクタントとして、ブタの肺洗浄液からクロロホルムとメタノールで抽出し、アセトン沈殿法により得られた修飾サーファクタント (modified surfactant, MS) を用いた。また、SP-B/C は、MS からカラムクロマトグラフィーで分離した。MS および作成した SRS を、自己の肺サーファクタントが欠如しているウサギ未熟胎仔の肺内に投与して、活性の評価を行った。何も投与しない対照群では、25cmH₂O の最大吸気圧 (peak inspiratory pressure, PIP) でも 3ml/kg 以下の換気量しか得られなかった。これに対して、MS を投与した群 (MS 群) では、PIP が 25cmH₂O、20cmH₂O、および 15cmH₂O のときの換気量が、それぞれ 30.4±5.6ml/kg (\bar{x} ±SD)、17.9±5.4ml/kg、および 9.0±3.2ml/kg であった (対照群に比し $p<0.05$)。脂質が S-DPPC のみの SRS-1 を投与した群の換気量は、対照群と差がなかった。脂質組成として S-DPPC と e-PG の重量比が 90:10 の SRS-2 を投与した群の換気量は、すべての PIP で、対照群より大きかったが、MS 群より有意に小さかった。脂質組成として S-DPPC と e-PG の重量比が 80:20 の SRS-3 を投与した群では、PIP が 25cmH₂O のときの換気量は MS 群と同様であったが、PIP が 20cmH₂O および 15cmH₂O のときの換気量は MS 群より有意に小さかった。脂質組成として S-DPPC と e-PG と S-DOPC の 3 者の重量比が 60:20:20 の SRS-4 を投与した群の換気量は、すべての PIP で MS 群と同様であった。以上より、サーファクタントの活性に関与する脂質としては、ジパルミトイルホスファチジルコリン (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) の他に、ホスファチジルグリセロール (phosphatidylglycerol, PG) (今回の実験では、e-PG を使用) と不飽和ホスファチジルコリン (unsaturated phosphatidylcholine, u-PC) (今回の実験では、S-DOPC を使用) が必要であると結論された。

Key words phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, pulmonary surfactant, reconstituted surfactant, immature newborn rabbit

肺サーファクタントは、表面張力を低下させる作用 (表面活性作用) により、肺コンプライアンスを増加させ、機能的残気量や換気量を正常に保っている物質である。肺胞洗浄液から遠心法により分離された白濁物質 (肺サーファクタントを多く含む物質) には、おおよその数値として、リン脂質が 77%、中性脂質が 12%、遊離脂肪酸が 1%、蛋白質が 8%、その他が 2%¹⁾ 含まれている。また、最も量が多いリン脂質の内訳は、ジパルミトイルホスファチジルコリン (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) が 40% 前後、不飽和ホスファチジルコリン (unsaturated phosphatidylcholine, u-PC) が 25% 前後、ホスファチジルグリセロール (phosphatidylglycerol, PG) が 7% 前後、その他が 5% 前後になっている¹²⁾。これらの各物質のうち、蛋白質については研究が進んでおり、4 種類のもの、すなわちサーファクタント関連蛋白質 (surfactant-associated protein, SP)-A, B, C および

D が同定されている³⁴⁾。しかし、脂質に関する検討は十分であるとは言えず、DPPC 以外のものについては、肺サーファクタントの構成成分であるのか、分離操作中に混入した夾雑物であるかが明確になっていない。

近年、上記の SP のうち、表面活性作用の発現に対して、親水性の SP-A と SP-D はほとんど関与していないが、疎水性の SP-B と SP-C は不可欠であることが判明している³⁵⁾。このことから、内容が判明している脂質に SP-B と SP-C を加えた再構築サーファクタントを作成し、それらの表面活性作用を測定すれば、サーファクタントを構成する脂質を同定できるのではないかと考えられる。今回著者は、表面活性に必要な脂質の種類を同定する目的で、ブタ肺洗浄液から抽出した脂質分画、および数種の合成リン脂質の組合わせにブタの SP-B と SP-C を添加した再構築サーファクタントを作成し、それらの表面活性作

平成 7 年 12 月 7 日受付、平成 8 年 1 月 5 日受理

Abbreviations: DOPC, dioleoylphosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; e-PG, egg phosphatidylglycerol; γ_{\max} , maximum γ ; γ_{\min} , minimum γ ; IPPV, intermittent positive pressure ventilation; L-MS, lipid-rich fraction of MS; MRS, modified reconstituted surfactant; MS, modified surfactant; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PIP, peak inspiratory pressure; P-MS, protein-rich fraction of

用を測定した。なお、この測定には、自己の肺サーファクタントが欠如しているウサギ未熟胎仔の肺内に試料を注入して換気量や静的肺圧量曲線の変化をみる生物学的方法と、気泡型表面張力計による物理学的方法の二者を用いた。

材料および方法

I. 修飾サーファクタント (modified surfactant, MS) の作成、脂質分画と蛋白分画の分離、および組成の分析

1. MS の作成

屠殺直後のブタの肺を生理食塩水で洗浄し、回収した肺胞洗浄液中の細胞成分を遠心 ($150 \times g$, 10 分間) して除去した。次いで、上清を遠心 ($2000 \times g$, 1 時間, 4°C) し、得られた沈渣 (白濁層) からクロロホルムとメタノール (体積比, 2:1) の混合液による抽出⁹, および 0.5% の食塩水を用いた Folch 洗浄⁷ により親水性蛋白 (主として SP-A と SP-D) を除去した。その後、アセトン沈殿法により中性脂質やコレステロールを除去したうえ、凍結乾燥したものを MS とした。

2. 脂質分画と蛋白分画の分離

約 1000mg の MS に、エタノールとジエチルエーテルの混合液 (体積比, 3:2) を 100ml 加え、 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ に冷却したうえ、遠心 ($1000 \times g$, 1 時間) して沈渣を分離した⁸。この沈渣に対し上記の処置を再度行ったうえ、ジエチルエーテル ($0 \sim 4^\circ\text{C}$) を加えて一昼夜静置し、不溶物質を MS から得られた蛋白質の多い分画 (protein-rich fraction of MS, P-MS) とした。また、溶媒に移行したものは、全てを一緒にして、脂質が主体の分画 (lipid-rich fraction of MS, L-MS) とした。なお、得られた L-MS と P-MS の重量比は約 93:7 であった。

次いで、P-MS から、早稻田⁹ と同様の方法で SP-B と SP-C を抽出した。すなわち、窒素ガスで P-MS をいったん乾固したうえ、0.1規定の塩酸を 5% 含んだクロロホルム・メタノール (体積比, 1:1) の混合液に再溶解した。この溶液を、大きさが $2.5 \times 80\text{cm}$ のセファデックス LH-60 カラム (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden) に通し、合計 64 本の試験管に分割抽出した¹⁰。各試験管について、蛋白質定量 (後述) とリン脂質定量 (後述) を行った。蛋白質については分子量測定 (後述) を行い、SP-B と SP-C を含む試験管内容を一括して SP-B/C とし、以後の実験に供した。

3. 試料の分析

各試料の脂質の定量には Bartlett の方法¹¹ とガスクロマトグラフィ GC-9A (島津, 東京) を併用し、脂質の種類の判定は薄層クロマトグラフィ (展開液としてクロロホルム, メタノール, 酢酸, アセトン, および水の体積比が 40:25:7:4:2 の混合液を使用) によった。また、蛋白質の定量には micro-Kjeldahl 法¹² を用い、その分子量を Swank らの方法¹³ による SDS-PAGE で判定した。

II. 再構築サーファクタントの作成

L-MS と P-MS を 93:7 の重量比で再混合し、元の MS と同じ組成にしたものを修飾再構築サーファクタント (modified reconstituted surfactant, MRS) とした。また、合成再構築サーファクタント (synthetic reconstituted surfactant, SRS) の 1 つ

として、合成ジパルミトイルホスファチジルコリン (synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine, S-DPPC) と P-MS を 93:7 の重量比で混合し、SRS-1 として実験に供した。なお、S-DPPC にはジパルミトイル-L- α -ホスファチジルコリン (dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine) (Sigma Chemical, St. Louis, USA) を用いた。

これらとは別に、S-DPPC, PG として卵黄由来のホスファチジル-DL- α -グリセロール (egg phosphatidyl-DL- α -glycerol, e-PG) (Sigma Chemical), および u-PC の一種として合成ジオレイルホスファチジルコリン (synthetic dioleoylphosphatidylcholine, S-DOPC) (Sigma Chemical) を用意し、これらの脂質の種々の組合わせに重量比で 2% の SP-B/C を添加した SRS を作成した。すなわち、脂質組成として、S-DPPC と e-PG の重量比が 90:10 の SRS-2, S-DPPC と e-PG の重量比が 80:20 の SRS-3, および S-DPPC と e-PG と S-DOPC の 3 者の重量比が 60:20:20 の SRS-4 を調整し実験に供した。各試料は、クロロホルム・メタノールの混合液 (体積比, 2:1) に溶解して混合した。

III. 各試料の生物学的活性測定

各種サーファクタントと試料を 2 つに大別し、それらの生物学的活性を実験 1 および実験 2 で測定した。すなわち、実験 1 では、L-MS, MRS, および SRS-1 を自己の肺サーファクタントが欠如しているウサギ未熟胎仔の肺内に投与し、換気量、生存率、および肺圧量曲線などに対する改善効果を MS と比較した。また、実験 2 では、SRS-2, SRS-3, SRS-4 について、実験 1 と同様の方法で MS と比較するとともに、肺組織所見も比較した。なお、この際、各種サーファクタントと試料は、窒素ガスで溶媒を除去したうえ、生理食塩水を加えて攪拌し、リン脂質濃度を 50mg/ml に調整した分散液として使用した。

1. 動物実験 1

1) 換気量の測定

交配後 25 日 16 時間から 23 時間の妊娠ウサギ (日本白色種) (満期妊娠日数, 31 日) 10 羽を、塩酸ケタミン 30mg/kg の筋注およびペントバルビタール 20mg/kg の静注により麻酔し、帝王切開により合計 46 羽の胎仔を娩出した。直ちに、これらの胎仔の体重を測定し、腹腔内にペントバルビタール 0.5mg を投与したうえ、気管に 18 ゲージの金属カニューレを挿入した。その後、同腹の胎仔 (3~10 羽) に対し、無作為に各試料の分散液のいずれかを $100\mu\text{l}$ あて気道内に注入し、それぞれ MS 群 ($n=10$), L-MS 群 ($n=10$), MRS 群 ($n=10$), SRS-1 群 ($n=6$) とした。また、気道内に何も投与しない動物を対照群 ($n=10$) とした。上記の操作が終了した後、 37°C に保ったプレチスモグラフ装置¹⁴ の気密室内に胎仔を収容した (図 1)。先に収容された胎仔は、同腹の全胎仔の準備が終了するまで $5\text{cmH}_2\text{O}$ の持続的気道内陽圧呼吸のもとに待機させた。

全胎仔の準備が終了した後、臭化バンクロニウム 0.02mg を腹腔内に投与して胎仔を非動化し、従圧式の間欠的陽圧換気 (intermittent positive pressure ventilation, IPPV) を開始した。人工呼吸器には、Servo 900B (Siemens-Elcoma, Solna, Sweden) を用い、作動圧を変えることによって最大吸気圧

MS ; PS, phosphatidylserine ; S-DOPC, synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine ; SP, surfactant-associated

dioleoylphosphatidylcholine ; S-DPPC, synthetic protein ; SRS, synthetic reconstituted surfactant ;

u-PC, unsaturated phosphatidylcholine

(peak inspiratory pressure, PIP)を調節した。呼吸回数を1分間40回、吸気と呼気の時間比を1:1とし、圧波形が矩形波となるように換気条件を設定した。吸気ガスには純酸素を用い、人工呼吸器のガス駆出量の上限を、同時に測定する全被験動物の予測換気量の10倍以上(7 l/min)に設定した。実験中は、人工呼吸器の回路内圧を常時監視し、設定した換気条件が保たれていることを確認した。また、各胎仔の換気量は、各気密室に接続した気流抵抗管前後の圧差を差圧検出器 TP-602T (日本光電, 東京)で検出し、その出力を積分器 AR-601R (日本光電)に導いて求めた¹⁵⁾。

IPPV 開始後、最初の1分間は、気管内に投与した試料が肺胞まで到達するように、PIP を 35cmH₂O に設定した。次いで、PIP を 25cmH₂O にして15分間換気し、その後は 20, 15cmH₂O と5分ごとに変化させ、各 PIP での胎仔の換気量を測定した。

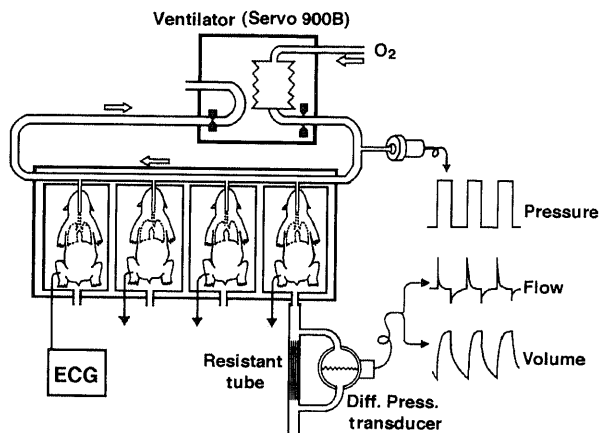


Fig. 1. System for the recording of tidal volumes in immature newborn rabbits. The animals were tracheotomized and treated with various samples or not treated (controls), and kept in the air tight chambers (multiple plethysmographs). They were connected in parallel to the respirator which is set at pressure mode ventilation. The tidal volume was calculated by integration of pressure difference across the resistant tube attached to the plethysmograph. Diff. Press., different pressure; O₂, 100% oxygen; ECG, electrocardiograph.

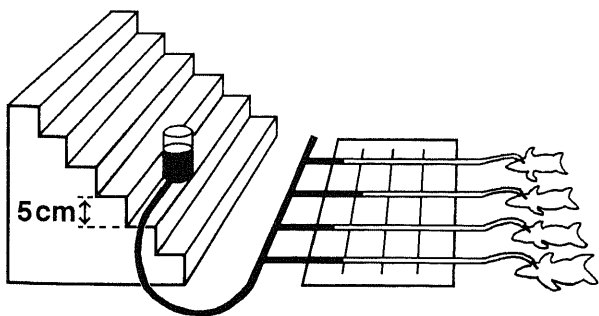


Fig. 2. Equipment for the recording of pressure-volume characteristics in immature newborn rabbits. The tracheotomized animals were connected to a system of horizontal polyethylene tubes, an opposite ends of which were connected to a bottle that contains stained water. Air volumes that go in the animal lungs by the stepwise increase of the insufflation pressure were measured from the movement of the stained water.

2) 生存率の判定

換気量の測定を行った直後、針電極を用いて、各ウサギ未熟胎仔の心電図を記録した。心電図上、QRS 波の頻度が1分間120個以上のものを生存動物と判定した(ウサギ未熟胎仔の心拍数は240~320/分)。

3) 肺圧量曲線の測定

生存率の判定後、過量のペントバルビタールを腹腔内に注射して胎仔を屠殺し、肺を虚脱させるため37℃で30分以上、大気圧下に放置した。その後、胎仔の気管内カニューレに長さ50cm、内径1.62mmのポリエチレンチューブを接続し、各チューブを水平に保持し、その他端を指示液が入った容器につないだ。指示液の液面を1分間隔で5cmずつ高めることにより0cmH₂Oから30cmH₂Oまで段階的に肺を加圧した後、同様に0cmH₂Oまで減圧した(図2)。その際、肺に出入りする空気量をチューブ内の指示液の移動距離から測定した¹⁵⁾。なお、装置内における空気の圧縮は測定後に補正した。

2. 動物実験 2

1) 換気量、生存率、および肺圧量曲線の測定

9羽の母ウサギから娩出した40羽のウサギ未熟胎仔を無作為に5群に分けた。すなわち、MS, SRS-2, SRS-3, およびSRS-4の分散液を100μlあて気管内に注入したものを、それぞれMS群(n=10), SRS-2群(n=7), SRS-3群(n=7), およびSRS-4群(n=6)とし、何も投与しない胎仔を対照群(n=10)として、その換気量、生存率、および肺圧量曲線を実験1と同様の方法で調査した。

2) 肺組織所見

肺圧量曲線を測定後、Nilssonら¹⁷⁾の方法に従い、肺組織を固定した。すなわち、胸郭を除去し、気道に30cmH₂Oの圧を加えて肺胞をできるだけ開いた後、減圧して10cmH₂Oに保持し、肺動脈に留置したカテーテルより4%ホルムアルデヒド(pH=7.4)を65cmH₂Oの圧で30分間持続灌流し、肺組織を固定した。HE染色後、肺の矢状断切片を鏡検し、IからIVの4グレードに分類した。すなわち、視野中に占める肺胞腔の割合が、目測で75%以上のものをグレードI、74~50%のものをグレードII、49~25%のものをグレードIII、24%以下のものをグレードIVとした。

IV. 表面張力の測定

各種サーファクタントと試料の表面張力(γ)を、気泡型表面張力計 PBS (Electronics, NY, USA)¹⁸⁾により調査した。この測定では、ウサギ未熟胎仔に投与した各分散液にさらに生理食塩水を加え、リン脂質濃度を10mg/mlに調整した。まず、これらの分散液を37℃に加温した測定室に入れ、気泡を作成した。次いで、気泡を半径0.40と0.55mmの間で、40cpmの速度で拍動させた。5分間拍動させた後、気泡の収縮力と半径からLaplaceの式($P=2\gamma/R$, P =気泡内外の圧差, R =気泡半径)によりγを求めた。気泡の半径が最大のときの表面張力を最大表面張力(maximum γ, γ_{max})、最小のときを最小表面張力(minimum γ, γ_{min})とした。

V. 統計処理

換気量、肺圧量曲線、および表面張力の測定結果は、 $\bar{x} \pm S.D.$ で表し、群間の有意差判定には一元配置分散分析を行ったうえ、Schefféの多重比較テストを用いた。生存率の有意差判定には、Fisherの直接確率計算法を用いた。また、肺組織所見の有意差判定には、Wilcoxon順位和検定(Mann-

Whitney U test) を用いた。いずれも、危険率 (p) が 0.05 以下を有意とした。

成 績

1. 試料の組成

表 1 に、MS の組成を示した。リン脂質が 98.0% を占め、その他の脂質は 0.9% にすぎなかった。MS 中の蛋白質としては SP-B と SP-C のみが認められ、それらを合計したものの割合は 1.1% であった。また、SP-B と SP-C の比は、およそ 1:2 であった。

表 2 に示すように、L-MS は、0.06% の SP-C を含有していたが、99.9% 以上が脂質であった。P-MS は、元の MS に比べ蛋白質の濃度が 15 倍以上になっていたが、まだ 83.6% の量の脂質が認められた。カラムクロマトグラフィーで P-MS を分析した結果、図 3 で示すように、15~24 番目の試験管に SP-B が、25~35 番目の試験管に SP-C が抽出されていた。なお、これらを一括した SP-B/C には、脂質がほとんど存在しないものと判定された。

Table 1. Composition of modified surfactant (MS)

| Composition | Weight (%) |
|--------------------------|------------|
| Phospholipids | |
| Phosphatidylcholine | 66.2 |
| Phosphatidylglycerol* | 7.7 |
| Sphingomyeline | 7.4 |
| Phosphatidylethanolamine | 6.2 |
| Phosphatidylinositol* | 4.6 |
| Phosphatidylserine* | 4.1 |
| Other phospholipids | 1.8 |
| Other lipids | |
| Fatty acid | 0.4 |
| Cholesterol | 0.2 |
| Cholesterol ester | 0.2 |
| Triglyceride | 0.1 |
| Proteins | |
| SP-B | 0.4 |
| SP-C | 0.7 |

The lipid composition was assayed by thin-layer and gas chromatography. SP-B, surfactant-associated protein B; SP-C, surfactant-associated protein C.

*, acidic phospholipid.

Table 2. Composition of lipid-rich fraction (L-MS) and protein-rich fraction (P-MS) separated from modified surfactant (MS)

| Fraction | Weight (%) | | |
|----------|------------|------|------|
| | Lipid | SP-B | SP-C |
| L-MS | >99.9 | 0 | 0.06 |
| P-MS | 83.6 | 5.7 | 10.7 |

The composition of L-MS and P-MS were assayed by Bartlett's method and micro-Kjeldahl method. SP-B, surfactant-associated protein B; SP-C, surfactant-associated protein C.

II. 動物実験 1

1. 生存率

表 3 に、各群の生存率を示した。MS 群および MRS 群では、全例が生存し、対照群 (10%) に比べて有意に良好な生存率を示した。一方、L-MS 群および SRS-1 群の生存率 (60% および 33%) は、MS 群より有意に低いものであった。なお、5 群間の胎仔の体重の平均値は、26.8~30.8g であり、群間に有意差は認められなかった。

2. 換気量

図 4 に、MS, L-MS, MRS, SRS-1 の各群、および対照群の換気量を示した。対照群では、いずれの PIP でも 3ml/kg 以下の換気量しか得られなかった。これに対し、MS 群の換気量は、PIP が 15cmH₂O で 9.0 ± 3.2 ml/kg, 20cmH₂O で 17.9 ± 5.4 ml/kg, 25cmH₂O で 30.4 ± 5.6 ml/kg と、対照群に比べ有意に大きい値を示した。また、MRS 群の換気量は、すべての PIP で、MS 群との間に有意差を認めなかった。一方、L-MS 群および SRS-1 群の換気量は、すべての PIP で MS 群より有意に小さく、対照群とはほぼ同じであった。

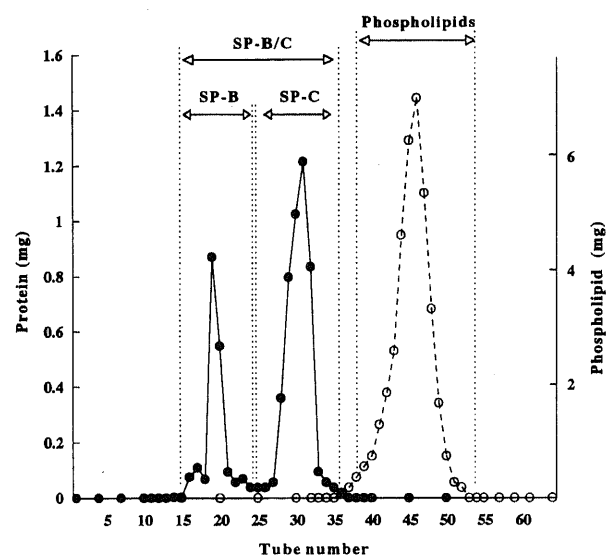


Fig. 3. Elution pattern of surfactant-associated proteins B and C (SP-B/C) and phospholipids from modified surfactant on a column of Sephadex LH-60. Column size, 2.5×80 cm; chloroform/methanol 1:1 (v/v), containing 5% 0.1 N HCl; flow rate, 4 ml/hr.

Table 3. Characteristics of immature newborn rabbits in animal experiment 1

| Group | Number of rabbits examined | Survival rate (%) | Body weight (g, $\bar{x} \pm SD$) |
|---------|----------------------------|-------------------|------------------------------------|
| MS | 10 | 100 | 29.3±4.0 |
| L-MS | 10 | 60* | 27.9±4.6 |
| MRS | 10 | 100 | 26.8±6.9 |
| SRS-1 | 6 | 33* | 30.8±5.1 |
| Control | 10 | 10* | 28.9±4.2 |

MS, modified surfactant; L-MS, lipid-rich fraction separated from MS; MRS, modified reconstituted surfactant composed of L-MS plus protein-rich fraction separated from MS (P-MS); SRS-1, synthetic reconstituted surfactant composed of dipalmitoylphosphatidylcholine plus P-MS. *P<0.05 vs MS group.

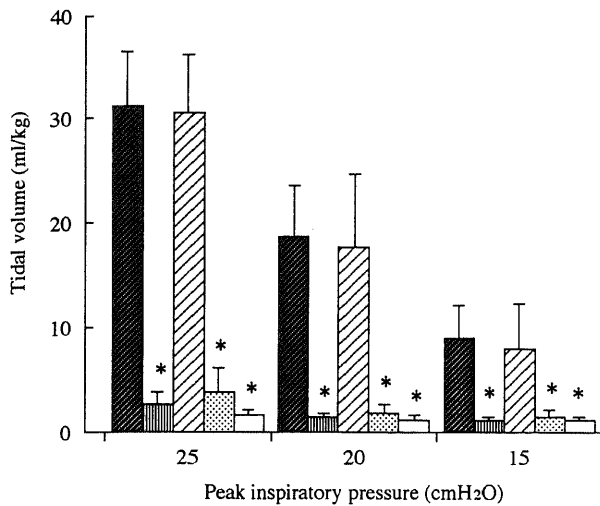


Fig. 4. Tidal volume at various peak inspiratory pressures in animal experiment 1. The animals were treated with modified surfactant (MS) (■, n=10), lipid-rich fraction separated from MS (L-MS) (▨, n=10), modified reconstituted surfactant composed of L-MS plus protein-rich fraction separated from MS (P-MS) (▤, n=10), synthetic reconstituted surfactant composed of synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine plus P-MS (▦, n=6), or no materials as the control (□, n=10). Values are $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$ vs MS group.

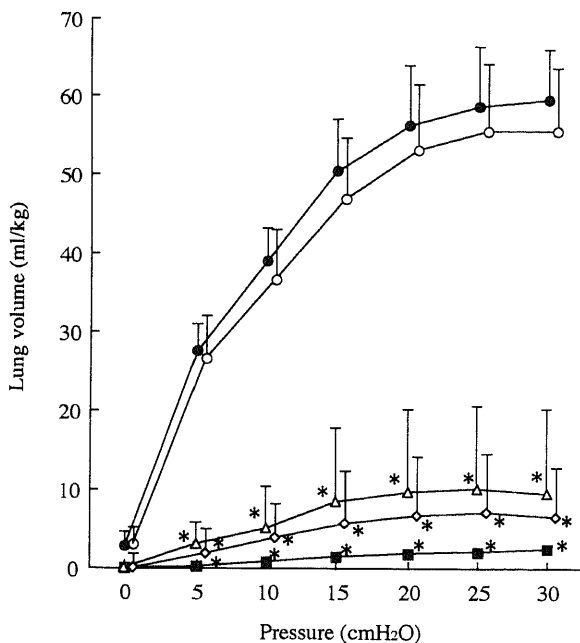


Fig. 5. Static pressure-volume curves of the lung-thorax system during deflation in animal experiment 1. The animals were treated with modified surfactant (MS) (●, n=10), lipid-rich fraction separated from MS (L-MS) (◇, n=10), modified reconstituted surfactant composed of L-MS plus protein-rich fraction separated from MS (P-MS) (○, n=10), synthetic reconstituted surfactant composed of synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine plus P-MS (△, n=6), or no materials as the control (■, n=10). Values are $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$ vs MS group.

3. 静的肺圧量曲線

図5に、MS, L-MS, MRS, SRS-1の各群、および対照群の減圧時における肺圧量曲線を示した。換気量と同様、すべての測定圧においてMS群の肺容量は対照群より有意に大きい値を示した。MRS群の肺容量は、MS群との間に有意差がなかった。一方、L-MS群およびSRS-1群の肺容量は、MS群より有意に小さく、対照群に近いものであった。

Ⅲ. 動物実験2

1. 生存率

表4に、各群の生存率を示した。SRS-2, SRS-3, およびSRS-4群の生存率は86~100%であり、MS群の生存率(100%)と差がなかった。一方、対照群では、全例が死亡した。なお、5群間の胎子の体重の平均値は、25.0~29.8gであり、群間に有意差は認められなかった。

2. 換気量

図6に、各群ウサギ未熟胎子の換気量を示した。対照群とMS群の換気量は、動物実験1で認められた所見と同様であった。SRS-2群の換気量は、すべてのPIPで、対照群より大きかったが、MS群より有意に小さかった。SRS-3群の換気量は、PIPが25cmH₂OであればMS群との間に有意差を示さなかったが、PIPが20cmH₂O以下になるとMS群より有意に小さくなった。SRS-4群の換気量は、すべてのPIPで、MS群と有意差が認められなかった。

3. 静的肺容量曲線

図7に、各群の減圧時における静的肺圧量曲線を示した。

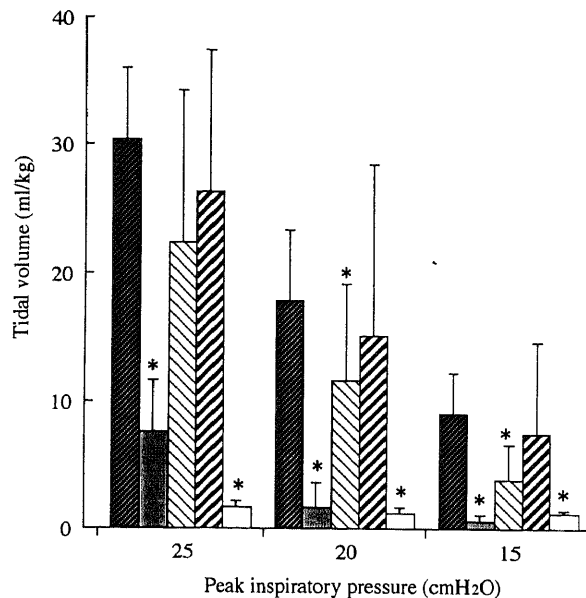


Fig. 6. Tidal volume at various peak inspiratory pressures in animal experiment 2. The animals were treated with modified surfactant (MS) (■, n=10), synthetic reconstituted surfactant (SRS) whose lipids composed of synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine (S-DPPC) and egg phosphatidylglycerol (e-PG) at a ratio of 90:10 (w:w) plus surfactant-associated proteins B and C (SP-B/C) (▨, n=7), SRS whose lipids composed of S-DPPC and e-PG at a ratio of 80:20 (w:w) plus SP-B/C (▤, n=7), SRS whose lipids composed of S-DPPC, e-PG and synthetic dioleoylphosphatidylcholine at a ratio of 60:20:20 (w:w) plus SP-B/C (▦, n=6), or no materials as the control (□, n=10). Values are $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$ vs MS group.

SRS-2 群は、MS 群と比較して有意に小さい値を示したが、対照群よりは大きいものであった。SRS-3 群および SRS-4 群の肺容量は、MS 群との間に有意差が認められなかった。

4. 組織所見の結果

肺組織の分類結果を図 8 に示した。MS 群では、70%以上がグレード I であった。一方、対照群では、80%以上がグレード IV であった。SRS-2 群、SRS-3 群、および SRS-4 群の所見

は、MS 群との間に有意差が認められなかった。

IV. 表面張力

表 5 に、各種サーファクタントおよび L-MS の気泡型表面張力計で測定した γ を示した。MS の γ_{\min} は 1.1mN/m 前後、 γ_{\max} は 29.7mN/m 前後であった。L-MS の γ_{\min} と γ_{\max} の平均値は、それぞれ 20.8mN/m と 58.7mN/m であり、MS より有意に大きい値を示した。MRS, SRS-2, SRS-3, および SRS-4 の

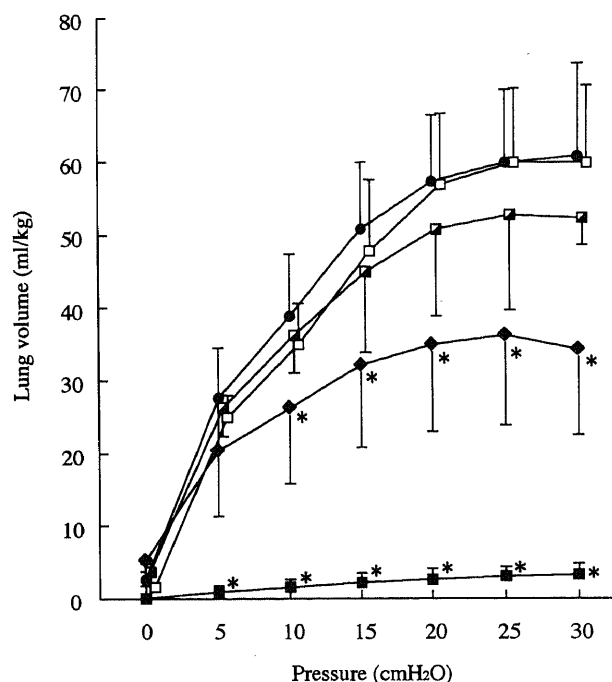


Fig. 7. Static pressure-volume curves of the lung-thorax system during deflation in animal experiment 2. The animals were treated with modified surfactant (MS) (●, $n=10$), synthetic reconstituted surfactant (SRS) whose lipids composed of synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine (S-DPPC) and egg phosphatidylglycerol (e-PG) at a ratio of 90:10 (w:w) plus surfactant-associated proteins B and C (SP-B/C) (◆, $n=7$), SRS whose lipids composed of S-DPPC and e-PG at a ratio of 80:20 (w:w) plus SP-B/C (■, $n=7$), SRS whose lipids composed of S-DPPC, e-PG and synthetic dioleoylphosphatidylcholine at a ratio of 60:20:20 (w:w:w) plus SP-B/C (□, $n=6$), or no materials as the control (■, $n=10$). Values are $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$ vs MS group.

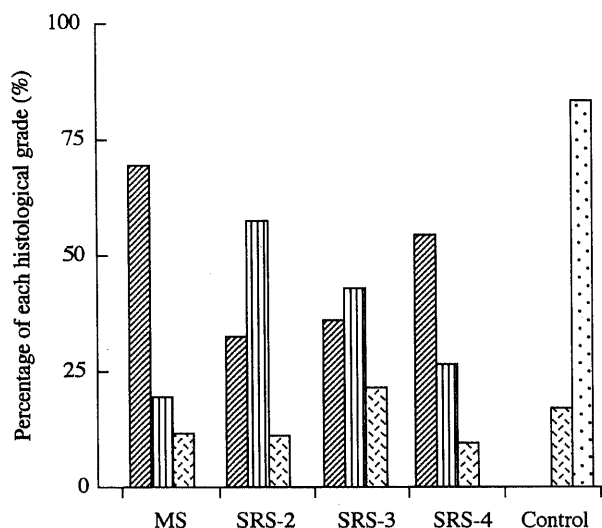


Fig. 8. Histological findings of the lung classified into the grades I, II, III and IV in immature newborn rabbits treated with surfactants or no material. Grades I (▨), II (▧), III (▩), and IV (▤) indicate the ratios of the alveolar air space to total visual field are more than 75%, 74~50%, 49~25%, and less than 24%, respectively. MS, the group treated with modified surfactant; SRS-2, the group treated with synthetic reconstituted surfactant (SRS) whose lipids composed of synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine (S-DPPC) and egg phosphatidylglycerol (e-PG) at a ratio of 90:10 (w:w) plus surfactant-associated proteins B and C (SP-B/C); SRS-3, the group treated with SRS whose lipids composed of S-DPPC and e-PG at a ratio of 80:20 (w:w) plus SP-B/C; SRS-4, the group treated with SRS whose lipids composed of S-DPPC, e-PG and synthetic dioleoylphosphatidylcholine at a ratio of 60:20:20 (w:w:w) plus SP-B/C; Control, the group treated with no materials. Grade IV was not found in MS, SRS-2, SRS-3 and SRS-4 groups. On the other hand, grade I and II were not found in control group.

Table 4. Administered material and characteristics of immature newborn rabbits in animal experiment 2

| Group | Lipid composition (%) | | | Number of rabbits examined | Survival rate (%) | Body weight (g, $\bar{x} \pm SD$) |
|---------|-----------------------|------------------|------------------|----------------------------|-------------------|------------------------------------|
| | S-DPPC | e-PG | S-DOPC | | | |
| MS | nt ^{a)} | nt ^{a)} | nt ^{a)} | 10 | 100 | 29.8 \pm 4.0 |
| SRS-2 | 90 | 10 | 0 | 7 | 100 | 23.8 \pm 1.7 |
| SRS-3 | 80 | 20 | 0 | 7 | 86 | 25.0 \pm 1.7 |
| SRS-4 | 60 | 20 | 20 | 6 | 100 | 27.2 \pm 3.2 |
| Control | 0 | 0 | 0 | 10 | 0* | 28.6 \pm 4.6 |

a) not added; see Table 1 for lipid composition of MS. S-DPPC, synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine; e-PG, egg phosphatidylglycerol; S-DOPC, synthetic dioleoylphosphatidylcholine; MS, modified surfactant; SRS-2, synthetic reconstituted surfactant-2; SRS-3, synthetic reconstituted surfactant-3; SRS-4, synthetic reconstituted surfactant-4. * $P < 0.05$ vs MS group.

Table 5. Surface tensions of modified surfactant and reconstituted surfactants

| Group | Number of measurements | (mN/m, $\bar{x} \pm SD$) | (mN/m, $\bar{x} \pm SD$) |
|-------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| MS | 6 | 1.1 \pm 0.7 | 29.7 \pm 0.8 |
| L-MS | 4 | 20.8 \pm 3.7* | 58.7 \pm 2.4* |
| MRS | 6 | 0.7 \pm 0.8 | 30.1 \pm 0.7 |
| SRS-2 | 5 | 2.8 \pm 1.1 | 28.6 \pm 0.5 |
| SRS-3 | 5 | 1.5 \pm 0.7 | 29.2 \pm 0.6 |
| SRS-4 | 5 | 2.2 \pm 0.5 | 29.5 \pm 0.8 |

MS, modified surfactant; L-MS, lipid-rich fraction separated from MS; MRS, modified reconstituted surfactant composed of L-MS plus protein-rich fraction separated from MS (P-MS); SRS-2, synthetic reconstituted surfactant whose lipids composed of synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine (S-DPPC) and egg phosphatidylglycerol (e-PG) at a ratio of 90:10 (w:w) plus surfactant-associated proteins B and C (SP-B/C); SRS-3, synthetic reconstituted surfactant whose lipids composed of S-DPPC and e-PG at a ratio of 80:20 (w:w) plus SP-B/C; SRS-4, synthetic reconstituted surfactant whose lipids composed of S-DPPC, e-PG and synthetic dioleoylphosphatidylcholine at a ratio of 60:20:20 (w:w:w) plus SP-B/C.

γ_{\min} , minimum surface tension. γ_{\max} , maximum surface tension. The concentration of MS and reconstituted surfactants in physiological saline was adjusted to 10mg/ml.

* $p < 0.05$ vs MS.

γ_{\min} と γ_{\max} は、ともに MS と有意差がなかった。なお、SRS-1 は、生理食塩水に分散できなかったため、表面張力を測定しなかった。

考 察

今回著者が用いたウサギ未熟胎仔による測定法は、新生児呼吸窮迫症候群に対する補充療法用サーファクタントの活性を、臨床により近い条件で判定する方法として確立されたものである¹⁹⁾。すなわち、在胎26日未満のウサギ未熟胎仔(満期妊娠日数, 31日)は、自己の肺サーファクタントが欠如しており、人工呼吸を施行しても極めて小さい換気量しか得られず、肺胞含気量がほとんど認められないと言われている。一方、この未熟胎仔に各種のサーファクタントを補充すると、その活性に見合っ上記の所見が好転する^{20)~22)}。今回の実験においても、何も投与しなかったウサギ未熟胎仔(対照群)では、換気量、肺圧量曲線、および肺組織所見のいずれもが、肺サーファクタントの欠如していることを示していた。一方、MS を投与した胎仔では、これらの所見が有意に改善した。MS は、天然肺サーファクタントを多く含む白濁層から SP-A および SP-D と中性脂質を除去したものであるが、天然肺サーファクタントと同程度の活性を示すことが証明されている⁹⁾。したがって、MS を基準として、今回の各試料の活性を検討しても問題はないと考えうる。

サーファクタントの機能発現には、SP-B や SP-C などの疎水性蛋白質が不可欠であると報告されている^{5)9)23)~25)}。今回の実験で、蛋白質をほとんど含まない L-MS を未熟胎仔に投与しても、換気量や肺圧量曲線が全く改善しなかったこと、および L-MS の γ_{\min} と γ_{\max} が MRS より有意に高い値を示したことは、上記の報告を再確認するものである。

飽和脂肪鎖を持つ DPPC は、気液界面で炭化水素鎖を気相に向けて配列し、表面張力を下げる作用の主役であることが判明している。気液界面での DPPC の単分子膜は、圧縮されると水分子を介在しない状態で規則正しく配列し、表面張力を 1mN/m 以下に低下させる²⁶⁾。しかし、純粋な DPPC は、相転移温度が41℃であり²⁷⁾、これより低い温度では結晶状態にある

ため、水に添加しても気液界面に配列することができない²⁸⁾。今回の実験で、S-DPPC に蛋白分画である P-MS を加えた SRS-1 は活性を示さなかった。MS と MRS の活性が等しかったことより、P-MS の分離および再合成の操作に問題はないと考えられる。したがって、SRS-1 の活性がほとんど見られなかったことは、DPPC 以外の脂質が必要であることを示すものと思われる。すなわち、DPPC の相転移温度を低下させ、気液界面への吸着を促進させる他の脂質が必要であると思われる。

動物実験 2 は、種々の合成脂質を組み合わせたものに蛋白質を加え、サーファクタントの活性と脂質の組成の関係を調べたものである。合成脂質の選択とその割合については、まず MS を参考にし、DPPC に次ぐ第2脂質として PG を選んだ。なお、今回の実験では、種々の PG のうち、比較的入手しやすいという理由から e-PG を使用した。さらに、白濁層の PC の中には、DPPC 以外に不飽和の脂肪鎖を持つ u-PC が多く含まれており、その中でもオレイル基を持つジオレイルホスファチジルコリン (dioleoylphosphatidylcholine, DOPC) が多いと言われている²⁹⁾。このことより、今回の実験では、S-DOPC を第3の脂質として採用した。なお、SP-B/C の量については、早稲田が報告した必要最小量 (0.6%)⁹⁾ の約3倍 (2.0%) とし、P-MS に含まれるわずかな脂質の影響も考え、カラムクロマトグラフィで分離したほぼ純粋な SP-B/C を使用した。

DPPC に電荷を持った酸性リン脂質を加えると、より安定した膜を形成すると言われている³⁰⁾³¹⁾。また、荷電を持つ分子の存在は、水中で DPPC の乳化を安定させる³⁰⁾。PG は、負の荷電を持つ酸性リン脂質である。DPPC に PG を加えた物質は、表面張力が小さい³¹⁾³²⁾ ことや、生理的な表面活性を持つ³¹⁾³³⁾ ことが報告されている。今回の実験でも、S-DPPC に e-PG を加えた SRS-2 と SRS-3 は、SRS-1 に比べて、ウサギ未熟胎仔の換気量を有意に大きく発現させ、肺圧量曲線を好転させる作用も有意に強かった。なお、PG は、生体の pH では正に荷電している SP-B や SP-C と電気的に結合し³⁴⁾³⁵⁾、サーファクタントとしての活性を強める作用も持っていると考えられる。

PG の割合に関しては、e-PG を10%含む SRS-2 に比べて、20%含む SRS-3 の方が、ウサギ未熟胎仔に対してより大きい

換気量を発現させた。MS 中の酸性リン脂質には、PG の他に、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol, PI) やホスファチジルセリン (phosphatidylserine, PS) が存在する。酸性リン脂質としての PG, PI, および PS は互いに代償できると言われ、PG が減少したサーファクタントには PI の割合が上昇しているという報告³⁶⁾³⁷⁾ もみられる。MS に含まれる PG は 7.7% であるが、PI (4.6%) や PS (4.1%) を含めた酸性脂質と DPPC との比を考えると、10% の PG では不足であると結論される。今回の実験結果および MS に含まれる酸性リン脂質の量から、PG の量は 15~20% が適当であろうと考えられる。

現時点では、u-PC は肺サーファクタントを構成する脂質として、あまり注目されていない。田中らは、肺圧量曲線およびウィルヘルミー型表面張力計により、種々の合成サーファクタントの表面活性を調べた結果、u-PC の有無により表面活性は変化しないと報告している³⁸⁾。一方、今回の実験で、S-DPPC と e-PG に u-PC の一種である S-DOPC を加えた SRS-4 は、MS と同程度の活性を示した。DPPC に DOPC を加えると相転移温度が下がる³⁹⁾。また、DOPC は、DPPC の流動性を増して表面吸着速度や表面拡散速度を促進させる^{25)40)~42)}。このことから、田中らの結果と今回の実験結果の違いは、静的測定法を用いたか、動的測定法を用いたかの差によるものと考えられる。

今回著者が行った換気量の測定は、1 分間に 40 回の換気を行うという動的なものである。一方、肺圧量曲線は、1 分間同じ気道内圧を保持したときの肺容量を測定する静的なものである。呼吸時に肺泡が収縮して気液界面から肺泡被覆層内部に移行したサーファクタント分子は、吸気時に再び気液界面に吸着しなければならない。静的な肺圧量曲線は、サーファクタント分子の表面吸着速度を反映しない⁴³⁾。すなわち、表面吸着速度の遅いサーファクタントは、静的な肺圧量曲線を改善できても、動きが早い呼吸運動にはついていけず、十分な換気量が得られないものと考えられる。事実、DOPC を含まない SRS-3 では、静的肺圧量曲線は MS と同様であったが、換気量は十分なものであった。また、肺組織を検索した結果では、SRS-2, SRS-3, SRS-4 の 3 群と MS 群との間に差がみられなかった。このことは、静的条件下で固定した肺組織標本を検索しても、サーファクタントの活性を正確に判定できないものと考えられる。このように、サーファクタントの生理的活性を知るには動的な方法での評価が必要である。

気泡型表面張力計は、サーファクタントの活性測定用に考案されたものであり、装置内に作成された気泡を肺泡とみなしている。 r_{min} は、呼吸時の肺泡の表面張力に相当し、10mN/m 以上の場合は、無気肺が形成されやすいと言われている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。SRS-2, SRS-3, および SRS-4 の r_{min} と r_{max} は、MS のそれと有意差がみられなかった。気泡型表面張力計による測定では、1 分間に 40 回、半径を 0.40~0.55mm の間で変化させた。しかし、同じ動的な条件であるにもかかわらず、換気量測定での結果と異なったのは、機能的残気量と換気量の比が生体と異なることに関係すると思われる。すなわち、今回用いた気泡型表面張力計による測定は、換気量が機能的残気量の約 1.6 倍 $[(0.55^3 - 0.40^3)/0.40^3]$ である状態に相当する (通常の呼吸では 0.2 倍前後)。このような気泡型表面張力計の非生理的な換気条件では、前述した肺泡の収縮と拡張に伴うサーファクタント分子の動きは正常と異なり、正確な情報を得ることができないものと思われる⁴⁶⁾。

今回、生理的活性を持つサーファクタントの作成に必要な脂質を検討するため、各種脂質の組合せにサーファクタントの疎水性蛋白を添加して活性を調べた。その結果、DPPC に加えて、PG および u-PC が必要であることを確認した。DPPC, PG, および u-PC からなる合成脂質の組合せによって、天然肺サーファクタントとほぼ等しい活性を示すものが作成できた。これまで、合成サーファクタントを作成するにあたって、DPPC 以外の脂質についての検討はあまり行われておらず、特に u-PC の有用性を生体で証明したものは多くない。現在、呼吸窮迫症候群を治療するための合成サーファクタントを作成する研究が進められている。今回の結果は、この研究に一つの方向を示唆するものと考えられる。

結 論

サーファクタントの作成に必要な脂質の種類と割合を検討するため、種々の合成リン脂質の組合せと蛋白質からなる再構築サーファクタントを作成して、生物学的および物理学的活性を調べた。その結果、以下の結論を得た。

1. 疎水性蛋白質である SP-B と SP-C は、サーファクタントの活性に不可欠な因子である。
2. サーファクタントの脂質として、飽和脂肪鎖を持つ DPPC だけでは不十分である。
3. 酸性リン脂質である PG は、サーファクタントの活性発現に必要な脂質である。サーファクタントの全脂質に対する PG の割合としては、15~20% が適当であると考えられる。
4. 不飽和脂肪鎖を持つ u-PC は、サーファクタントの動的条件下における性能を高め、換気量を増加させるために必要な物質である。DPPC, PG, および u-PC (重量比, 60:20:20) を混合して作成したサーファクタントは、天然肺サーファクタントとほぼ同様の活性を示した。
5. サーファクタントの活性を調べるためにいくつかの方法があるが、それらの結果は必ずしも一致しない。サーファクタントの活性を評価するには、より生理的狀態に近い換気量測定法を用いる必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導と御校閲をいただいた小林勉教授に深く感謝いたします。また本研究遂行にあたり御協力いただきました麻酔・蘇生学教室の諸先生方ならびに京都大学鈴木康弘教授に対し、厚く御礼申し上げます。なお、本研究は、文部省科学研究費 (一般 C 05671254 号および一般 B 07457353 号) の援助を受けたことを付記して謝意を表します。

文 献

- 1) Fisher, A. B. & Chander, A.: Lung surfactant-phospholipids and apoproteins. *Exp. Lung Res.*, 6, 171-174 (1984).
- 2) Mason, R. J. & Williams, M. C.: Phospholipid composition and ultrastructure of A 549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin. *Biochim. Biophys. Acta*, 617, 36-50 (1980).
- 3) Possmayer, F.: A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 138, 990-998 (1988).
- 4) Person, A., Rusk, K., Chang, D., Moxley, M.,

- Longmore, W. & Crouch, E.: A pneumocyte-derived collagenous surfactant-associated protein. *Biochemistry*, **27**, 8576-8584 (1988).
- 5) Yu, S. H. & Possmayer, F.: Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem. J.*, **236**, 85-89 (1986).
- 6) Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 7) Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A. & Lebaron, F. N.: Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.*, **191**, 833-841 (1951).
- 8) Suzuki, Y., Kogishi, K., Fujita, Y., Kina, T. & Nishikawa, S.: A monoclonal antibody to the 15,000 dalton protein associated with porcine pulmonary surfactant. *Exp. Lung Res.*, **11**, 61-73 (1986).
- 9) 早稲田祐子: 換気量増加に必要なサーファクタント関連蛋白の種類および量. 十全医会誌, 311-321, (1995).
- 10) Curstedt, T., Jörnvall, H., Robertson, B., Bergman, T. & Berggren, P.: The hydrophobic low-molecular-mass proteins of pulmonary surfactant. *Eur. J. Biochem.*, **168**, 255-262 (1987).
- 11) Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-471 (1959).
- 12) Thompson, J. F. & Morrison, G. R.: Determination of organic nitrogen. *Anal. Chem.*, **23**, 1153-1157 (1951).
- 13) Swank, R. T. & Munkres, K. D.: Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.*, **39**, 462-477 (1971).
- 14) Lachmann, B., Grossmann, G., Freyse, J. & Robertson, B.: Lung-thorax compliance in the artificially ventilated premature rabbit neonate in relation to variations in inspiration: expiration rate. *Pediatr. Res.*, **15**, 833-838 (1981).
- 15) Lachmann, B., Grossmann, G., Nilsson, R. & Robertson, B.: Lung mechanics during spontaneous ventilation in premature and fullterm rabbit neonates. *Respir. Physiol.*, **38**, 283-302 (1979).
- 16) Enhörning, G. & Robertson, B.: Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics*, **50**, 58-66 (1972).
- 17) Nilsson, R., Grossmann, G. & Robertson, B.: Lung surfactant and the pathogenesis of neonatal bronchiolar lesions induced by artificial ventilation. *Pediatr. Res.*, **12**, 249-255 (1978).
- 18) Enhörning, G.: Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J. Appl. Physiol.*, **43**, 198-203 (1977).
- 19) Robertson, B. & Lachmann, B.: Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Exp. Lung Res.*, **14**, 279-310 (1988).
- 20) Robertson, B., Curstedt, T., Grossmann, G., Kobayashi, T., Kokubo, M. & Suzuki, Y.: Prolonged ventilation of the premature newborn rabbit after treatment with natural or apoprotein-based artificial surfactant. *Eur. J. Pediatr.*, **147**, 168-173 (1988).
- 21) Kobayashi, T., Grossmann, G., Robertson, B. & Ueda, T.: Effects of artificial and natural surfactant supplementation in immature newborn rabbits. *日界面医会誌*, **15**, 53-59 (1984).
- 22) 小林 勉, 泉 恵子, 元塚雅也, 村上誠一, 小久保雅之: 人工肺サーファクタントの界面特性と生理学的機能との相関. *日界面医会誌*, **16**, 51-57 (1985).
- 23) Takahashi, A. & Fujiwara, T.: Proteolipid in bovine lung surfactant: its role in surfactant function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 527-532 (1986).
- 24) Hall, S. B., Venkitaraman, A. R., Whitsett, J. A., Holm, B. A. & Notter, R. H.: Importance of hydrophobic apoproteins as constituents of clinical exogenous surfactants. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145**, 24-30 (1992).
- 25) Kobayashi, T., Nitta, K., Takahashi, R., Kurashima, K., Robertson, B. & Suzuki, Y.: Activity of pulmonary surfactant after blocking the associated proteins SP-A and SP-B. *J. Appl. Physiol.*, **71**, 530-536 (1991).
- 26) Notter, R. H.; Tabak, S. A. & Mavis, R. D.: Surface properties of binary mixtures of some pulmonary surfactant components. *J. Lipid Res.*, **21**, 10-22 (1980).
- 27) Albon, N. & Sturtevant, J. M.: Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2258-2260 (1978).
- 28) Bangham, A. D., Morly, C. J. & Philips, M. C.: The physical properties of an effective lung surfactant. *Biophys. Acta*, **573**, 552-556 (1979).
- 29) 田中勇次, 武井恒知, 金沢洋作, 清田恵一, 増田和夫, 木内 詮, 藤原哲郎: 肺 Surfactant の調製ならびにその化学組成と表面活性. *日界面医誌*, **13**, 27-34 (1982).
- 30) Tanaka, Y., Takei, T. & Masuda, K.: Lung surfactant III. Correlations among activities in vitro, in situ and in vivo and chemical composition. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 4110-4115 (1983).
- 31) Grossmann, G., Larsson, I., Nilsson, R., Rydhag, L. & Stenius, P.: Lung expansion in premature newborn rabbits treated with emulsified synthetic surfactant; principles for experimental evaluation of synthetic substitutes for pulmonary surfactant. *Respiration*, **45**, 327-338 (1984).
- 32) Ikegami, M., Silverman, J. & Adams, F. H.: Restoration of lung pressure-volume characteristics with various phospholipids. *Pediatr. Res.*, **13**, 777-780 (1979).
- 33) Morley, C. J., Bangham, A. D., Miller, N. & Davis, J. A.: Dry artificial lung surfactant and its effect on very premature babies. *Lancet*, January 10, 64-68 (1981).
- 34) Johansson, J., Curstedt, T. & Robertson, B.: The proteins of the surfactant system. *Eur. J. Respir.*, **7**, 372-391 (1994).
- 35) Pérez-Gil, J., Casals, C. & Marsh, D.: Interactions of hydrophobic lung surfactant proteins SP-B and SP-C with dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidyl-

glycerol bilayers studied by electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **34**, 3964-3971 (1995).

36) Beppu, O. S., Clements, J. A. & Goerke, J.: Phosphatidylglycerol-deficient lung surfactant has normal properties. *J. Appl. Physiol.*, **55**, 496-502 (1983).

37) Hallman, M. & Gluck, L.: Development of the fetal lung. *J. Perinat. Med.*, **5**, 3-31 (1977).

38) 田中勇次, 武井恒知, 金沢洋作, 木内 詮, 藤原哲郎: 化学成分調整による肺Surfactantの再構成. *日界面医誌*, **13**, 43-50 (1982).

39) Phillips, M. C., Ladbrooke, B. D. & Chapman, D.: Molecular interactions in mixed lecithin systems. *Biochim. Biophys. Acta.*, **196**, 35-44 (1970).

40) Hawco, M. W., Davis, P. J. & Keough, K. M. W.: Lipid fluidity in lung surfactant: Monolayers of saturated and unsaturated lecithins. *J. Appl. Physiol.*, **51**, 509-515 (1981).

41) Bangham, A. D.: Lung surfactant: how it does and does not work. *Lung*, **165**, 17-25 (1987).

42) Vodyanoy, V., Bluestone, G. L. & Longmuir, K. J.: Surface properties of two rabbit lung lamellar body preparations with markedly different fatty acid profiles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1047**, 284-289 (1990).

43) 高橋麗子, 小林 勉, 李 文志, 谷口淳朗, 紫藤明美, 村上誠一: 補充療法様サーファクタントの活性測定法に関する検討: 動的方法と準静的方法の比較. *北陸麻酔誌*, **25**, 41-48 (1991).

44) King, R. J. & Clements, J. A.: Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological correlations. *Am. J. Physiol.*, **223**, 715-726 (1972).

45) Notter, R. H. & Finkelstein, J. N.: Pulmonary surfactant: An interdisciplinary approach. *J. Appl. Physiol.*, **57**, 1613-1624 (1984).

46) Kobayashi, T., Li, W. -Z., Tashiro, K., Takahashi, R., Waseda, Y., Yamamoto, K. & Suzuki, Y.: Disparity between tidal and static volume of immature lungs treated with reconstituted surfactants. *J. Appl. Physiol.*, (in press).

Lipid Components Necessary to Increase the Activity of Pulmonary Surfactant Reiko Takahashi, Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **105**, 71—80 (1996)

Key words phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, pulmonary surfactant, reconstituted surfactant, immature newborn rabbit

Abstract

To investigate the indispensable lipids for pulmonary surfactant activity, 4 synthetic reconstituted surfactants (SRS-1, SRS-2, SRS-3 and SRS-4) were made by adding surfactant-associated proteins B and C (SP-B/C) to phospholipid mixtures which consisted of synthetic dipalmitoylphosphatidylcholine (S-DPPC), egg phosphatidylglycerol (e-PG) and synthetic dioleoylphosphatidylcholine (S-DOPC) in various ratios. In addition, a reference surfactant, i.e., a modified surfactant (MS), was prepared from porcine lung lavage fluid using chloroform-methanol extraction and acetone precipitation techniques. The SP-B/C was extracted from MS by column chromatography. The activity of these surfactants was then evaluated in immature newborn rabbits that were deficient in their own pulmonary surfactant. The animals receiving no material (control group) showed less than 3 ml/kg of tidal volume under mechanical ventilation with a peak inspiratory pressure (PIP) of 25 cmH₂O. In contrast, the animals receiving MS (MS group) exhibited 30.4 ± 5.6 ml/kg ($\bar{x} \pm SD$), 17.9 ± 5.4 ml/kg and 9.0 ± 3.2 ml/kg of tidal volumes at the PIP of 25, 20 and 15 cmH₂O, respectively ($p < 0.05$ vs the control group). The tidal volumes of the animals receiving SRS-1, whose lipids were composed of mostly S-DPPC, were almost the same as the control group. The tidal volumes of the animals receiving SRS-2, whose lipids were composed of S-DPPC and e-PG at a ratio of 90:10 (w:w), were significantly bigger than those of the control group, but significantly smaller than those of the MS group at any PIP. In animals receiving SRS-3 whose lipids were composed of S-DPPC and e-PG at a ratio of 80:20 (w:w), the tidal volume at PIP of 25 cmH₂O was the same as that of the MS group, but those at the PIP of 20 and 15 cmH₂O were smaller than the MS group. The tidal volumes in the animals receiving SRS-4 whose lipids were composed of S-DPPC, e-PG and S-DOPC at a ratio of 60:20:20 (w:w:w) were the same as the MS group at any PIP. It is concluded from these results that not only dipalmitoylphosphatidylcholine (a kind of saturated phosphatidylcholine) but also phosphatidylglycerol (represented by e-PG in the present study) and unsaturated phosphatidylcholine (represented by S-DOPC in the present study) are playing some important roles in the activity of pulmonary surfactant.